

29 JUN 2005 3

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 5 月 6 日 (06.05.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/039559 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 31/202, 31/232,  
31/66, A61P 9/10, 9/00, A23L 1/30

5308203 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号  
Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/016351

(22) 国際出願日: 2004 年 10 月 28 日 (28.10.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2003-369147  
2003 年 10 月 29 日 (29.10.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サン  
トリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒

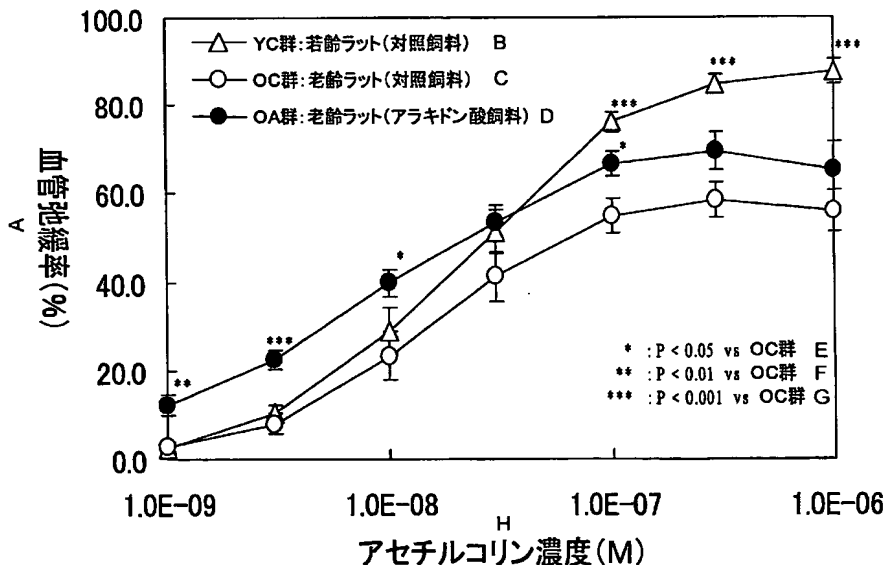
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石倉 義之  
(ISHIKURA, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒5670874 大阪府  
茨木市奈良町 5-205 Osaka (JP). 堀川 千賀  
(HORIKAWA, Chika) [JP/JP]; 〒5670868 大阪府茨木  
市沢良宜西 1-17-2-504 Osaka (JP). 小野  
佳子 (ONO, Yoshiko) [JP/JP]; 〒5330022 大阪府大阪市  
東淀川区菅原 1 丁目 13-18-802 Osaka (JP).  
秋元 健吾 (AKIMOTO, Kengo) [JP/JP]; 〒2110036 神  
奈川県川崎市中原区井田杉山町 2-75-404  
Kanagawa (JP). 松村 靖夫 (MATSUMURA, Yasuo)  
[JP/JP]; 〒6392142 奈良県北葛城郡新庄町北道穂  
66 番地 Nara (JP).

[続葉有]

(54) Title: COMPOSITION FUNCTIONING TO PREVENT OR MITIGATE SYMPTOM OR DISEASE ATTRIBUTABLE TO  
BLOOD VESSEL AGING

(54) 発明の名称: 血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する組成物



(57) Abstract: A composition and a food or beverage which have the function of preventing or mitigating symptoms or diseases attributable to the aging of blood vessels, and which each contains arachidonic acid or a compound having arachidonic acid as a constituent fatty acid.

(57) 要約: アラキドン酸またはアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を含んで成る、血管の老化に起因する症状又は疾患の予防又は改善作用を有する組成物及び飲食物。

A...PERCENTAGE RELAXATION OF BLOOD VESSEL (%)  
B...GROUP YC: YOUNG RAT (CONTROL FEED)  
C...GROUP OC: OLD RAT (CONTROL FEED)  
D...GROUP OA: OLD RAT (ARACHIDONIC-ACID FEED)  
E...P<0.05 VS GROUP OC  
F...P<0.01 VS GROUP OC  
G...P<0.001 VS GROUP OC  
H...CONCENTRATION OF ACETYLCHOLINE (M)

WO 2005/039559 A1



(74) 代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423  
東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する組成物

### 技術分野

本発明は、アラキドン酸またはアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を有効成分とする、血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する組成物、並びに血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する飲食品及びその製造方法に関するものである。より詳細には、アラキドン酸、アラキドン酸のアルコールエステル、アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリド、さらにリン脂質の群から選ばれた少なくともひとつを有効成分とする血管の弾力性の低下、動脈硬化（たとえば、虚血性心疾患（心筋梗塞、狭心症）や脳卒中（脳出血、脳梗塞））の予防又は改善作用を有する組成物、さらには予防又は改善作用を有する飲食物及びその製造方法に関するものである。

### 背景技術

近年、医療の進歩に伴って急激な高齢化社会に向かっている。それに伴って動脈硬化症患者数も増加している。「平成12年度版厚生白書」並びに「脳梗塞性老人対策検討報告書」によれば、2000年度の動脈硬化症患者は150～160万人であり、65歳以上の動脈硬化症患者は14人に1人に達している。そして、2030年には10人に1人と着実に患者数が増加すると予想されている。動脈硬化は大きく、粥状動脈硬化、中膜石灰化硬化、細動脈硬化の3つに分けられる。

臨床的に重要なのは粥状動脈硬化で、好発部位は大動脈から四肢

の動脈、冠動脈、脳底部動脈などである。動脈硬化が進行すると虚血性心疾患、頸動脈狭窄を含む脳梗塞、閉塞性動脈硬化症の症状が認められるようになり、日常生活や社会生活に支障をきたす。粥状動脈硬化の危険因子としては、高コレステロール血症以外にも加齢、高血圧、糖尿病、喫煙、冠動脈疾患の家族歴、低HDL-コレステロール血症などがあるが、それらが粥状動脈硬化を促進する機序は種々の因子が複合した結果と考えられている（薬局 54, 2245-2249, 2003）。

こうした考え方から、動脈硬化性疾患に対しては推測される危険因子に応じた高脂血症治療薬、高血圧治療薬、糖尿病治療薬などによる一次予防的な治療と、虚血性心疾患や脳梗塞の症状に応じた抗血小板薬、ACE阻害薬、 $\beta$ 遮断薬、抗凝固薬、脳保護薬などによる二次予防的な治療が一般に行われている（薬局 54, 2287-2303, 2003）。しかし、そのほとんどは、脳における血栓形成を抑制する抗血小板凝集薬や抗トロンビン薬、脳虚血における細胞障害を抑制する脳保護薬や動脈硬化の危険因子である高脂血症に対する高脂血症治療薬、高血圧に対する降圧剤等の対症療法であり、血管の老化に伴う変化を改善する薬剤は全く知られていない。

動脈硬化性疾患は血管が関与する。その血管の細胞膜を構成するリン脂質には、高度不飽和脂肪酸、主としてアラキドン酸、エイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸が構成脂肪酸として結合している。しかし、これら高度不飽和脂肪酸は動物体内ではde novo合成できず、直接的あるいは間接的（アラキドン酸の場合は、前駆体となるリノール酸を、エイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸の場合は、前駆体となる $\alpha$ -リノレン酸を）に食事から摂取する必要がある。これまで、リノール酸や $\alpha$ -リノレン酸を含めた高度不飽和脂肪酸には、血中コレステロール低下作用があり、動脈硬

化予防効果が期待されると考えられて注目されてきた（食糧・栄養・健康，72-78，1991）。

しかし、一方でn-6系の高度不飽和脂肪酸であるリノール酸の摂りすぎはかえって動脈硬化を悪化させるという報告もあり（臨床栄養 87，254-259，1995）、動脈硬化の予防にn-3系の高度不飽和脂肪酸である $\alpha$ -リノレン酸、エイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸の積極的な摂取が進められている。そして、医薬品としても、高脂血症および閉塞性動脈硬化症の治療薬としてエイコサペンタエン酸エチルエステルが上市されているが、そのメカニズムは血管の細胞膜に対する作用ではなく、コレステロールの低下作用に基づいている。

非特許文献 1 平成12年度版厚生白書

非特許文献 2 薬局 54，2245-2249，2003

非特許文献 3 薬局 54，2287-2303，2003

非特許文献 4 食糧・栄養・健康，72-78，1991

非特許文献 5 臨床栄養 87，254-259，1995

## 発明の開示

したがって、血管の老化を予防し、血管自身の弾力性を保つことによって、血管の老化に起因する症状あるいは疾患を予防または改善し、さらには食品への適応に優れた副作用の少ない化合物の開発が強く望まれている。

従って本発明等は、アラキドン酸またはアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を有効成分とする、血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する組成物、並びに血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する飲食品及びその製造方法を提供しようとするものである。

より詳細には、アラキドン酸、アラキドン酸のアルコールエステル、アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリド、さらにリン脂質の群から選ばれた少なくともひとつを有効成分とする血管の弾力性の低下、動脈硬化（たとえば、虚血性心疾患（心筋梗塞、狭心症）や脳卒中（脳出血、脳梗塞））の予防又は改善作用を有する組成物、さらには予防又は改善作用を有する飲食物及びその製造方法を提供しようとするものである。

本発明者等は、アラキドン酸またはアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を有効成分とする、血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善効果を明らかにする目的で鋭意研究した結果、驚くべきことに、20ヶ月齢を超える老齢ラットを血管弛緩作用確認試験に供し、本発明の有効成分の効果を明らかにした。

さらに、微生物の産生するアラキドン酸を20%以上含有するトリグリセリドの工業生産に成功し、本発明の効果試験に供することが可能となり、効果を明らかにした。

さらに、酵素法により1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを含む油脂を製造することに成功し、本発明の効果試験に供することが可能となり、効果を明らかにした。

従って本発明により、アラキドン酸またはアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を有効成分とする、血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する組成物、並びに血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する飲食品及びその製造方法を提供する。より詳細には、アラキドン酸、アラキドン酸のアルコールエステル、アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリド、さらにリン脂質の群から選ばれた少なくともひとつを有効成分とする血管の弾力性の低下、動脈硬化（たとえば、虚血

性心疾患（心筋梗塞）や脳卒中（脳出血、脳梗塞）の予防又は改善作用を有する組成物、さらには予防又は改善作用を有する飲食物及びその製造方法を提供することができ、現代社会の人類において特に有用である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、老齢ラットの血管を用いたin vitro実験における、アセチルコリン濃度と血管弛緩率との関係を示すグラフである。

図2は、老齢ラットの胸部大動脈中のアラキドン酸含量に対するアラキドン酸含有飼料の効果を示すグラフである。

図3は、老齢ラットにおける、血管中のアラキドン酸含量と血管弛緩率との関係を示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明は、アラキドン酸またはアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を有効成分とする、血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する組成物、並びに血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する飲食品及びその製造方法に関するものである。

血管の老化に起因する症状あるいは疾患とは、血管の弾力性の低下、動脈硬化（例えば、虚血性心疾患（心筋梗塞、狭心症）や脳卒中（脳出血、脳梗塞））を挙げることができるが、これら症状あるいは疾患に限定しているわけではなく、血管の老化に起因する症状あるいは疾患はすべて含まれる。

P. Ghoshらは、12～14週齢の雌ラットに交配の10日前から出産後21日目まで高脂肪食（20%油脂配合）を与えると、離乳後に、通常食（3%油脂配合）に戻して、23週齢まで飼育したとしても、血管の

アセチルコリンによる弛緩反応（血管の弾力性の指標）は、交配の10日目から出産後21日まで通常食を与えた群に比べて小さくなることを報告している（J. Physiol. 533, 815-822, 2001）。

そして、高脂肪食群の親から生まれたラット血管のリン脂質中の脂肪酸組成は、離乳後に通常食で飼育しても、通常食群の親から生まれたラットと比較して、アラキドン酸の量が減少していた。しかし、通常食にはアラキドン酸が0.13%含有していることから、従来の考えではアラキドン酸の効果を期待することはできなかった。

本発明者等は、加齢に伴ってラットの血管弛緩反応が低下することに着目し、従来の考えを覆すアラキドン酸の効果を見出すことで本発明を完成させた。

本発明の有効成分はアラキドン酸であって、アラキドン酸を構成脂肪酸とするすべての化合物を利用することができる。アラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物には、アラキドン酸塩、例えばカルシウム塩、ナトリウム塩などを挙げることができる、また、アラキドン酸の低級アルコールエステル、例えばアラキドン酸メチルエステル、アラキドン酸エチルエステルなどを挙げることができる、また、アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリド、リン脂質、さらには糖脂質などを利用することができる。なお、本発明は上記に挙げたものに限定しているわけではなく、アラキドン酸を構成脂肪酸とするすべての化合物を利用することができる。

食品への適応を考えた場合には、アラキドン酸はトリグリセリドやリン脂質の形態、特にトリグリセリドの形態にすることが望ましい。アラキドン酸を含有するトリグリセリド（構成脂肪酸の一部又は全部がアラキドン酸を含有するトリグリセリドと同義）の天然界の給源はほとんど存在していなかった、本発明者等によりアラキドン酸を構成脂肪酸として含有するトリグリセリドを工業的に利用す



ることが可能となり、20ヶ月齢を超える老齢ラットの血管弛緩に及ぼす効果を評価することで、本発明の有効成分の効果を初めて明らかにし、血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善効果を有することを明確にした。

従って本発明においては、本発明の有効成分である構成脂肪酸の一部又は全部がアラキドン酸であるトリグリセリドを含有するトリグリセリド（アラキドン酸を含有するトリグリセリド）を使用することができる。アラキドン酸を含有するトリグリセリドとしては、トリグリセリドを構成する全脂肪酸のうちアラキドン酸の割合が20重量（W/W）%以上、好ましくは30重量%以上、より好ましくは40重量%以上である油脂（トリグリセリド）が食品を適用する場合には望ましい形態となる。したがって、本発明において、アラキドン酸を含有する油脂（トリグリセリド）を生産する能力を有する微生物を培養して得られたものであればすべて使用することができる。

アラキドン酸を含有する油脂（トリグリセリド）の生産能を有する微生物としては、モルティエセラ（Mortierella）属、コニディオボラス（Conidiobolus）属、フィチウム（Pythium）属、フィトフトラ（Phytophthora）属、ペニシリウム（Penicillium）属、クラドスポリウム（Cladosporium）属、ムコール（Mucor）属、フザリウム（Fusarium）属、アスペルギルス（Aspergillus）属、ロードトルラ（Rhodotorula）属、エントモフトラ（Entomophthora）属、エキノスポランジウム（Echinosporangium）属、サブプロレグニア（Saprolegnia）属に属する微生物を挙げることができる。

モルティエセラ（Mortierella）属モルティエセラ（Mortierella）亜属に属する微生物では、例えばモルティエセラ・エロンガタ（Mortierella elongata）、モルティエセラ・エキシグア（Mortierella exigua）、モルティエセラ・フィグロフィラ（Mortierella hy

grophila)、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) 等を挙げる事ができる。具体的にはモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata) IF08570、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua) IF08571、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila) IF05941、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) IF08568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS529.72、CBS608.70、CBS754.68等の菌株を挙げる事ができる。

これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醗酵研究所 (IFO)、及び米国のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection, ATCC) 及び、Centrralbureau v oor Schimmelcultures (CBS) からなんら制限なく入手することができる。また本発明の研究グループが土壌から分離した菌株モルティエレラ・エロンガタ SAM0219 (微工研菌寄第8703号) (微工研条寄第1239号) を使用することもできる。

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の孢子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。

窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステープリカー、大豆タンパク、脱脂ダイズ、綿実カス等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。その他必要に応じリン酸塩、硫酸マグ

ネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1～40重量%、好ましくは1～25重量%の濃度するのが良い。初発の窒素源添加量は0.1～10重量%、好ましくは0.1～6重量%として、培養途中に窒素源を流加しても構わない。

さらに、培地炭素源濃度を制御することでアラキドン酸を45重量(W/W) %以上含有する油脂(トリグリセリド)を本発明の有効成分とすることもできる。培養は、培養2～4日目までが菌体増殖期、培養2～4日目以降が油脂蓄積期となる。初発の炭素源濃度は1～8重量%、好ましくは1～4重量%の濃度とし、菌体増殖期および油脂蓄積期の初期の間のみ炭素源を逐次添加し、逐次添加した炭素源の総和は2-20重量%、好ましくは5-15重量%とする。なお、菌体増殖期および油脂蓄積期初期の間での炭素源の逐次添加量は、初発の窒素源濃度に応じて添加し、培養7日目以降、好ましくは培養6日目以降、より好ましくは培養4日目以降の培地中の炭素源濃度を0となるようにすることで、アラキドン酸を45重量%以上含有する油脂(トリグリセリド)を得ることができ本発明の有効成分とすることができる。

アラキドン酸生産菌の培養温度は使用する微生物によりことなるが、5～40℃、好ましくは20～30℃とし、また20～30℃にて培養して菌体を増殖せしめた後5～20℃にて培養を続けて不飽和脂肪酸を生産せしめることもできる。このような温度管理によっても、生成脂肪酸中の高度不飽和脂肪酸の割合を上昇せしめることができる。培地のpHは4～10、好ましくは5～9として通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行う。培養は通常2～30日間、好ましくは5～20日間、より好ましくは5～15日間行う。

さらに、アラキドン酸を含有する油脂(トリグリセリド)中のア

アラキドン酸の割合を高める手だてとして、培地炭素源濃度を制御する以外に、アラキドン酸含有油脂に選択的加水分解を行ってアラキドン酸高含有油脂を得ることもできる。この選択的加水分解に用いられるリパーゼはトリグリセリドの位置特異性はなく、加水分解活性は二重結合の数に比例して低下するため、高度不飽和脂肪酸以外の脂肪酸のエステル結合が加水分解される。そして、生じたPUFA部分グリセリド間でエステル交換反応が起こるなどして、高度不飽和脂肪酸が高められたトリグリセリドとなる（「Enhancement of Arachidonic: Selective Hydrolysis of a Single-Cell Oil from Mortierella with Candida cylindracea Lipase」：J. Am. Oil Chem. Soc., 72, 1323-1327 (1998)）。

このように、アラキドン酸含有油脂に選択的加水分解を行って得たアラキドン酸を高含有する油脂（トリグリセリド）を本発明の有効成分とすることができる。本発明のアラキドン酸を含有する油脂（トリグリセリド）の全脂肪酸に対するアラキドン酸の割合は、他の脂肪酸の影響を排除する目的で高いほうが望ましいが、高い割合に限定しているわけではなく、実際には、食品に適応する場合にはアラキドン酸の絶対量が問題になる場合もあり、10重量%以上のアラキドン酸を含有する油脂（トリグリセリド）であっても実質的には使用することができる。

さらに、本発明では構成脂肪酸の一部又は全部がアラキドン酸であるトリグリセリドとして、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを使用することができる。また、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを5モル%以上、好ましくは10モル%以上、さらに好ましくは20モル%以上、最も好ましくは30モル%以上含む油脂（トリグリセリド）を使用することができる。上記トリグリセリドの1,3-位に結合す

る中鎖脂肪酸は、炭素数6-12個を有する脂肪酸から選ばれたものを利用できる。炭素数6-12個を有する脂肪酸として、例えば、カプリル酸又はカプリン酸等を挙げられ、特に1,3-カプリロイル-2-アラキドノイル-グリセロール（以後「8A8」とも称す）が好ましい。

これら、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドは、高齢者を対象した場合には、最適な油脂（トリグリセリド）となる。一般に油脂（トリグリセリド）を摂取し、小腸の中に入ると膵リパーゼで加水分解性されるが、この膵リパーゼが1,3-位特異的であり、トリグリセリドの1,3-位が切れて2分子の遊離脂肪酸ができ、同時に1分子の2-モノアシルグリセロール（2-MG）が生成する。この2-MGは非常に胆汁酸溶解性が高く吸収性が良いため、一般に2-位脂肪酸の方が、吸収性が良いと言われる。また、2-MGは胆汁酸に溶けると界面活性剂的な働きをして、遊離脂肪酸の吸収性を高める働きをする。

次に遊離脂肪酸と2-MGはコレステロールやリン脂質等と一緒に胆汁酸複合ミセルを生合成して小腸上皮細胞に取り込まれ、トリアシルグリセロールの再合成が起こり、最終的にはカイロミクロンとしてリンパに放出されていく。ところが、この膵リパーゼの脂肪酸特性は飽和脂肪酸に高く、アラキドン酸は切れにくい特徴を持っている。さらに問題なのは、膵リパーゼ活性が加齢に伴って低下することから、血管の老化に起因する症状および疾患になりやすい高齢者には、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドは最適な油脂（トリグリセリド）となる。

1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドの具体的な製造法のひとつとして、アラキドン酸を含有する油脂（トリグリセリド）及び中鎖脂肪酸の存在下で、トリグリセリドの1,3-位のエステル結合にのみ作用するリパーゼを作用させるこ

とで製造することができる。

原料となる油脂（トリグリセリド）はアラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドであり、トリグリセリドを構成する全脂肪酸に対するアラキドン酸の割合が高い場合には、未反応油脂（原料トリグリセリド並びに1,3-位の脂肪酸のうち一方のみが中鎖脂肪酸となったトリグリセリド）の増加による反応収率の低下を防ぐため、通常の酵素反応温度20-30℃より、高く30～50℃、好ましくは40～50℃とする。

トリグリセリドの1,3-位のエステル結合に特異的に作用するリパーゼとして、例えば、リゾプス（Rhizopus）属、リゾムコール（Rhizomucor）属、アスペルギルス（Aspergillus）属などの微生物が産生するもの、ブタ膵臓リパーゼなどを挙げるることができる。かかるリパーゼについては、市販のものを用いることができる。例えば、リゾプス・デレマー（Rhizopus delemar）のリパーゼ（田辺製薬（株）製、タリパーゼ）、リゾムコール・ミーハイ（Rhizomucor miehei）のリパーゼ（ノボ・ノルディスク（株）社製、リボザイムIM）、アセペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）のリパーゼ（天野製薬（株）、リパーゼA）等が挙げられるが、これら酵素に限定しているわけではなく、1,3-位特異的リパーゼであればすべて使用することができる。

上記リパーゼの使用形態は、反応効率を高める目的で反応温度を30℃以上、好ましくは40℃以上とするため、酵素の耐熱性を付加する目的で固定化担体に固定化したリパーゼを使用することが望ましい。固定化担体として多孔室（ハイポーラス）樹脂であって、約100オングストローム以上の孔径を有するイオン交換樹脂担体、例えばDowex MARATHON WBA等が挙げられる。しかし、これら固定化担体に限定しているわけではなく、耐熱性を付加できる固定化担体であ

ればすべて使用することができる。

固定化担体 1 に対して、1,3-位特異的リパーゼの水溶液0.5～20倍重量に懸濁し、懸濁液に対して2～5倍量の冷アセトン（例えば-80℃）を攪拌しながら徐々に加えて沈殿を形成させる。この沈殿物を減圧下で乾燥させて固定化酵素を調製することができる。さらに簡便な方法では、固定化担体1に対して、0.05～0.4倍量の1,3-位特異的リパーゼを最小限の水に溶解し、攪拌しながら固定化担体を混ぜ合わせ、減圧下で乾燥させて固定化酵素を調製することができる。この操作により約90%のリパーゼが担体に固定化されるが、このままではエステル交換活性は全く示さず、水1-10重量（w/v）%を加えた基質中で、好ましくは水1～3重量%を加えた基質中で前処理することで固定化酵素は最も効率よく活性化することができ製造に供することができる。

酵素の種類によっては、本反応系に加える水分量は極めて重要で、水を含まない場合はエステル交換が進行しにくくなり、また、水分量が多い場合には加水分解が起こり、グリセリドの回収率が低下する（加水分解が起こればジグリセリド、モノグリセリドが生成される）。しかし、この場合、前処理により活性した固定化酵素を使用することで、本反応系に加える水分量は重要ではなくなり、全く水を含まない系でも効率よくエステル交換反応を起こすことができる。さらに酵素剤の種類を選択することで前処理を省略することも可能である。

このように、耐熱性を有する固定化酵素を使用し、酵素反応温度を上げることで、1,3-位特異的リパーゼに反応性の低いアラキドン酸を含有する油脂（トリグリセリド）においても、反応効率を低下させることなく、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリド（8A8）を効率的に製造することができる。

血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する飲食品の製造法であって、アラキドン酸及び／又はアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を単独で、あるいはアラキドン酸が実質的に含有しない、あるいは含有していても僅かな飲食品原料とともに配合することができる。ここで、僅かな量とは、飲食物原料にアラキドン酸が含まれていたとしても、それを配合した食品組成物を人が摂取しても、後述する本発明の1日当たりのアラキドン酸の摂取量に達していない量を意味する。

特に構成脂肪酸の一部又は全部がアラキドン酸であるトリグリセリドの場合に、油脂（トリグリセリド）の用途に関しては無限の可能性があり、食品、飲料、化粧品、医薬品の原料並びに添加物として使用することができる。そして、その使用目的、使用量に関して何ら制限を受けるものではない。

例えば、食品組成物としては、一般食品の他、機能性食品、栄養補助食品、特定保健用食品、未熟児用調製乳、乳児用調製乳、乳児用食品、妊産婦食品又は老人用食品等を挙げることができる。油脂を含む食品例として、肉、魚、またはナッツ等の本来油脂を含む天然食品、スープ等の調理時に油脂を加える食品、ドーナッツ等の熱媒体として油脂を用いる食品、バター等の油脂食品、クッキー等の加工時に油脂を加える加工食品、あるいはハードビスケット等の加工仕上げ時に油脂を噴霧または塗布する食品等が挙げられる。さらに、油脂を含まない、農産食品、醗酵食品、畜産食品、水産食品、または飲料に添加することができる。さらに、機能性食品・医薬品の形態であっても構わなく、例えば、経腸栄養剤、粉末、顆粒、トローチ、内服液、懸濁液、乳濁液、シロップ等の加工形態であってもよい。

また本発明の組成物は、本発明の有効成分以外に、一般に飲食品



、医薬品または医薬部外品に用いられる各種担体や添加物を含んでよい。特に本発明の有効成分の酸化防止を防ぐ目的で抗酸化剤を含むことが望ましい。抗酸化剤として、例えば、トコフェロール類、フラボン誘導体、フィロズルシン類、コウジ酸、没食子酸誘導体、カテキン類、フキ酸、ゴシポール、ピラジン誘導体、セサモール、グアヤオール、グアヤク酸、p-クマリン酸、ノールジヒドログアヤテッチク酸、ステロール類、テルペン類、核酸塩基類、カロチノイド類、リグナン類などのような天然抗酸化剤およびアスコルビン酸パリミチン酸エステル、アスコルビン酸ステアリン酸エステル、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）、モノ-t-ブチルヒドロキノン（TBHQ）、4-ヒドロキシメチル-2,6-ジ-t-ブチルフェノール（HMBP）に代表されるような合成抗酸化剤を挙げることができる。

トコフェロール類では、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -トコフェロール、 $\gamma$ -トコフェロール、 $\delta$ -トコフェロール、 $\epsilon$ -トコフェロール、 $\zeta$ -トコフェロール、 $\eta$ -トコフェロールおよびトコフェロールエステル（酢酸トコフェロール等）、さらに、トコトリエノールを類縁化合物として挙げることができる。また、カロチノイド類では、例えば、 $\beta$ -カロチン、カンタキサンチン、アスタキサンチン等を挙げることができる。

本発明の組成物は、本発明の有効成分以外に、担体として、各種キャリアー担体、イクステンダー剤、希釈剤、増量剤、分散剤、賦形剤、結合剤溶剤（例、水、エタノール、植物油）、溶解補助剤、緩衝剤、溶解促進剤、ゲル化剤、懸濁化剤、小麦粉、米粉、でん粉、コーンスターチ、ポリサッカライド、ミルクタンパク質、コラーゲン、米油、レシチンなどが挙げられる。添加剤としては、例えば、ビタミン類、甘味料、有機酸、着色剤、香料、湿化防止剤、ファ

イバー、電解質、ミネラル、栄養素、抗酸化剤、保存剤、芳香剤、湿潤剤、天然の食物抽出物、野菜抽出物などを挙げることができるが、これらに限定しているわけではない。

アラキドン酸およびアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物の主薬効成分はアラキドン酸にある。アラキドン酸の一日あたり食事からの摂取量は関東地区で0.14g、関西地区で0.19-0.20gとの報告があり（脂質栄養学4，73-82，1995）、高齢者の場合には油脂の摂取量が低下する点、膵リパーゼ活性が低下する点などから相当量、さらにはそれ以上、アラキドン酸を摂取する必要がある。したがって、本発明のアラキドン酸およびアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物の成人（例えば、体重60kgとして）一日当たりの摂取量は、アラキドン酸量換算として、0.001g-20g、好ましくは0.01g-10g、より好ましくは0.05-5g、最も好ましくは0.1g-2gとする。

本発明の有効成分を実際に飲食品に適用する場合には、食品に配合するアラキドン酸の絶対量も重要となる。ただし、飲食品に配合する絶対量も、配合する飲食品の摂取量によって変化することから、構成脂肪酸の一部又は全部がアラキドン酸であるトリグリセリドを含有するトリグリセリドを食品に配合する場合には、アラキドン酸として0.001重量%以上、好ましくは0.01重量%以上、より好ましくは0.1重量%以上となるように配合する。さらに、1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを飲食品に配合する場合には、0.0003重量%以上、好ましくは0.003重量%以上、より好ましくは0.03重量%以上とする。

本発明の組成物を医薬品として使用する場合、製剤技術分野において慣用の方法、例えば、日本薬局方に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。

本発明の組成物を医薬品として使用する場合、組成物中の有効成

分の配分量は、本発明の目的が達成される限り特に限定されず、適宜適当な配合割合で使用可能である。

本発明の組成物を医薬品として使用する場合、投与単位形態で投与するのが望ましく、特に、経口投与が好ましい。本発明の組成物の投与量は、年齢、体重、症状、投与回数などのより異なるが、例えば、成人（約60kgとして）一日当たり本発明のアラキドン酸及び/又はアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を、アラキドン酸量換算として、通常約0.001g～20g、好ましくは0.01g～10g、より好ましくは0.05～5g、最も好ましくは0.1g～2gを一日1回-3回に分割して投与するのがよい。

血管の細胞膜を構成するリン脂質には、高度不飽和脂肪酸、主としてアラキドン酸、エイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸が構成脂肪酸として結合しており、バランスを考えた場合、エイコサペンタエン酸及び/又はドコサヘキサエン酸との組み合わせが望ましい。

そして、アラキドン酸とドコサヘキサエン酸の組み合わせにおいて、アラキドン酸／エイコサペンタエン酸及び/又はドコサヘキサエン酸比が0.25 - 8の範囲にある飲食物が最も望ましい。

#### 実施例

次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本発明は、実施例に限定されない。

#### 参考例 1. アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドの製造方法

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS754.68を用いた。グルコース1.8%、脱脂大豆粉3.1%、大豆油0.1%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.1%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05%及び $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.05%を含む培地6kLを、10kL培養槽に調製し、初発

pHを6.0に調整した。前培養液30Lを接種し、温度26℃、通気量 360 m<sup>3</sup>/h、槽内圧200kPaの条件で8日間の通気攪拌培養を行った。なお、攪拌数は溶存酸素濃度を10-15ppmを維持するように調整した。さらに、グルコース濃度を4日目までは流加法によって培地中のグルコース濃度が1-2.5%の範囲内となるように、それ以降は0.5-1%を維持した（上記の%は、重量（W/V）%を意味する）。

培養終了後、ろ過、乾燥によりアラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドを含有する菌体を回収し、得られた菌体からヘキサン抽出により油脂を抽出し、食用油脂の精製工程（脱ガム、脱酸、脱臭、脱色）を経て、アラキドン酸含有トリグリセリド（構成脂肪酸の一部又は全部がアラキドン酸であるトリグリセリドを含有するトリグリセリド）150kgを得た。得られた油脂（トリグリセリド）をメチルエステル化し、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析したところ、全脂肪酸に占めるアラキドン酸の割合は40.84%であった。

なお、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸などが、それぞれ11.63%、7.45%、7.73%、9.14%、2.23%、3.27%であった。さらに、上記アラキドン酸含有油脂（トリグリセリド）（SUNTGA40S）をエチルエステル化し、アラキドン酸エチルエステルを40%含む脂肪酸エチルエステル混合物から、定法的高速液体クロマトグラフィーによって、99%アラキドン酸エチルエステルを分離・精製した。

参考例 2. 1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリド(8A8)を5%以上含むトリグリセリドの製造

イオン交換樹脂担体（Dowex MARATHON WBA：ダウケミカル）100gを、Rhizopus delemarリパーゼ水溶液（タリパーゼ現末、12.5%：田辺製薬（株））80mlに懸濁し、240mlの冷アセトン（-80℃）を攪

拌し、減圧下で乾燥させて固定化リパーゼを得た。

次に、参考例 1 で得たアラキドン酸を40%含有するトリグリセリド (SUNTGA40S) 80g、カプリル酸160g、上記固定化リパーゼ12g、水4.8 mlを30℃で48時間、撹拌 (130rpm) しながら反応させた。反応終了後、反応液を取り除き、活性化された固定化酵素を得た。

次に、固定化リパーゼ (Rhizopus delemarリパーゼ、担体: Dowe x MARATHON WBA) 10gをジャケット付きガラスカラム (1.8 x 12.5cm、容量31.8ml) に充填し、参考例 1 で得たSUNTGA40Sとカプリル酸を1:2に混合した反応油脂を一定の流速 (4ml/h) でカラムに流し、連続反応を実施することで、反応油脂を400gを得た。なお、カラム温度は40～41℃とした。得られた反応油脂から未反応のカプリル酸及び遊離の脂肪酸を分子蒸留により取り除き、食用油脂の精製工程 (脱ガム、脱酸、脱臭、脱色) を経て、8A8を含有する油脂 (トリグリセリド) を得た。

そして、ガスクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーにより、得られた8A8含有油脂 (トリグリセリド) 中の8A8の割合を調べたところ、31.6%であった (なお、8P8、8O8、8L8、8G8、8D8の割合はそれぞれ0.6、7.9、15.1、5.2、4.8%であった。トリグリセリドの2-位結合する脂肪酸P、O、L、G、Dはそれぞれパルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、γ-リノレン酸、ジホモ-γ-リノレン酸を表し、8P8は1,3-カプリロイル-2-パルミトレイン-グリセロール、8O8は1,3-カプリロイル-2-オレオイル-グリセロール、8L8は1,3-カプリロイル-2-リノレオイル-グリセロール、8G8は1,3-カプリロイル-2-γ-リノレノイル-グリセロール、8D8は1,3-カプリロイル-2-ジホモ-γ-リノレノイル-グリセロールをいう)。なお、得られた8A8含有油脂 (トリグリセリド) から定法の高速液体クロマトグラフィーによって、96モル% 8A8を分離・精製した。

### 実施例 1. アセチルコリン血管弛緩反応試験によるSUNTGA40Sの評価

参考例 1 で調製したアラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリド（アラキドン酸含有油脂（SUNTGA40S））のアセチルコリン血管弛緩反応に及ぼす影響をラットを用いて調べた。老齢ラットの実験群として、19ヶ月齢雄性Fischer系ラット15匹を対照飼料群（8匹：0C群）とSUNTGA40S配合飼料群（7匹：0A群）の2群に分け、それぞれの群に、表 1 に示した対照飼料およびSUNTGA40S配合飼料を与えた。そして、若齢ラットをコントロール群として、1ヶ月齢雄性Fischer系ラット10匹に表 1 に示した対照飼料を与えた（10匹：YC群）。

表 1 実験食

	対照飼料	SUNTGA40S 配合飼料
カゼイン (g/kg)	200	200
DL-メチオニン	3	3
コーンスターチ	150	150
シュクロース	500	500
セルロースパウダー	50	50
コーンオイル	50	45
ミネラル類 AIN-76	35	35
ビタミン類 AIN-76	10	10
重酒石酸コリン	2	2
ビタミン E	0.05	0.05
SUNTGA40S	0	5

ラットの摂餌量は約20gで、SUNTGA40Sのラット一匹あたりの一日摂取量は100mgとなる。参考例 1 で調製したアラキドン酸含有油脂（SUNTGA40S）に結合する全脂肪酸の内、40%がアラキドン酸であることから、ラット一匹あたりの一日のアラキドン酸摂取量は40mgとなる。この40mgは人の摂取量に換算すると133mg/60kg/日に相当する。

飼育3ヶ月目（老齢ラットの場合は22ヶ月齢、若齢ラットの場合は4ヶ月齢）に胸部大動脈を摘出し、一部をin vitroでの血管弛緩反応試験に、残りの血管を脂肪酸組成分析に用いた。血管弛緩反応試験は、血管内皮を傷つけないように慎重に摘出した胸部大動脈を用いて血管リングを作製し、フェニレフリンで前収縮を起こさせた後、 $10^{-9}$ M～ $10^{-6}$ M濃度のアセチルコリンによる弛緩反応を測定した。その結果、若齢ラットと比較して、老齢ラットの血管の弛緩反応は明らかに低下したが、アラキドン酸含有油脂の摂取により、老齢ラットの血管弛緩反応を改善した（図1）。

次に、摘出した胸部大動脈からFolch法にて全脂質を抽出した。抽出した脂質をエタノールとの共沸で水を除去した後、10%塩酸-メタノールで脂肪酸メチルエステルとして、ガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成を分析した。その結果、若齢ラットと比較して、老齢ラットの血管単位重量あたりのアラキドン酸量は明らかに低下したが、アラキドン酸含有油脂の摂取により、老齢ラットの血管単位重量あたりのアラキドン酸量が増加した。（図2）。また、老齢ラットにおいて、胸部大動脈単位重量あたりのアラキドン酸含量とアセチルコリン $10^{-7}$ Mによる血管弛緩率の相関を求めた結果、アラキドン酸含量との間には有意で高い相関（ $R=0.92$ ）が認められた。（図3）。このように、アラキドン酸含有油脂を摂取することで、血管の弛緩能力あるいは血管の内皮細胞機能を改善することを初めて示し、その効果がアラキドン酸によることを初めて明らかにした。

#### 実施例2. アセチルコリン血管弛緩反応試験による8A8（96モル%）の評価

参考例2で調製した1,3-位に中鎖脂肪酸が、2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリド(8A8)のアセチルコリン血管弛緩反応に及ぼす影響をラットを用いて調べた。老齢ラットの実験群として、

19ヶ月齢雄性Fischer系ラット15匹を対照飼料群（8匹：0C群）と8A8配合飼料群（7匹：0B群）の2群に分け、それぞれの群に、表2に示した対照飼料および8A8配合飼料を与えた。そして、若齢ラットをコントロール群として、1ヶ月齢雄性Fischer系ラット10匹に表2に示した対照飼料を与えた（10匹：YC群）。なお、8A8配合飼料に使用した8A8は参考例2で得た96モル% 8A8を使用した。

表2 実験食

	対照飼料	8A8 配合飼料
カゼイン (g/kg)	200	200
DL-メチオニン	3	3
コーンスターチ	150	150
シュクロース	500	500
セルロースパウダー	50	50
コーンオイル	50	45
ミネラル類 AIN-76	35	35
ビタミン類 AIN-76	10	10
重酒石酸コリン	2	2
ビタミン E	0.05	0.05
8A8	0	4.2

ラットの摂餌量は約20gで、8A8の分子量が628.7となることから、8A8配合飼料群のラット一匹あたりの一日のアラキドン酸摂取量が40mgとなるよう実験食を設計した。この40mgは人の摂取量に換算すると133mg/60kg/日に相当する。

飼育3ヶ月目（老齢ラットの場合は22ヶ月齢、若齢ラットの場合は4ヶ月齢）に胸部大動脈を摘出し、一部をin vitroでの血管弛緩反応試験に、残りの血管を脂肪酸組成分析に用いた。血管弛緩反応試験は、血管内皮を傷つけないように慎重に摘出した胸部大動脈を用いて血管リングを作製し、フェニレフリンで前収縮を起こさせた後、 $10^{-9}$ M～ $10^{-6}$ M濃度のアセチルコリンによる弛緩反応を測定した。



その結果、アセチルコリン $10^{-7}$ Mによる血管弛緩率の平均は、コントロール飼料を摂取した若齢ラットで80.5%、コントロール飼料を摂取した老齢ラットで52.3%、8A8配合飼料を摂取した老齢ラットで62.7%と、8A8の摂取により、老齢ラットの血管弛緩反応を改善した。

### 実施例 3. アラキドン酸を構成脂肪酸とする油脂（トリグリセリド）配合カプセルの調製

ゼラチン100重量部及び食添グリセリン35重量部に水を加え50～60℃で溶解し、粘度2000cpのゼラチン被膜を調製した。次に参考例1で得たアラキドン酸含有油脂（トリグリセリド）にビタミンE油0.05重量%を混合し、内容物1を調製した。参考例2で得た8A8を32モル%含有する油脂（トリグリセリド）にビタミンE油0.05重量%を配合し、内容物2を調製した。

次に、参考例1で得たアラキドン酸含有油脂（トリグリセリド）50重量%と魚油（ツナ油：全脂肪酸に占めるエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の割合は、それぞれ5.1%および26.5%）50重量%で混合し、ビタミンE油0.05重量%を混合して内容物3を調製した。アラキドン酸含有油脂（トリグリセリド）80重量%と魚油（ツナ油：全脂肪酸に占めるエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の割合は、それぞれ5.1%および26.5%）20重量%で混合し、ビタミンE油0.05重量%を混合して内容物4を調製した。参考例1で得た99%アラキドン酸エチルエステルに、ビタミンE油0.05重量%を混合し内容物5を調製した。これら内容物1から5を用いて、常法によりカプセル成形及び乾燥を行い、一粒200mgの内容物を含有するソフトカプセルを製造した。

### 実施例 4. 脂肪輸液剤への使用

参考例2で得た8A8を32%含有する油脂（トリグリセリド）400g、

精製卵黄レシチン48g、オレイン酸20g、グリセリン100g及び0.1N苛性ソーダ40mlを加え、ホモジナイザーで分散させたのち、注射用蒸留水を加えて4リットルとする。これを高圧噴霧式乳化機にて乳化し、脂質乳液を調製した。該脂質乳液を200mlずつプラスチック製バッグに分注したのち、121℃、20分間、高圧蒸気滅菌処理して脂肪輸液剤とする。

#### 実施例 5. ジュースへの使用

$\beta$ -シクロデキストリン2gを20%エタノール水溶液20mlに添加し、ここにスターラーで攪拌しながら、参考例1で得たアラキドン酸含有トリグリセリド（ビタミンEを0.05重量%配合）100mgを加え、50℃で2時間インキュベートした。室温冷却（約1時間）後、さらに攪拌を続けながら4℃で10時間インキュベートした。生成した沈殿を、遠心分離により回収し、n-ヘキサンで洗浄後、凍結乾燥を行い、アラキドン酸含有トリグリセリドを含有するシクロデキストリン包接化合物1.8gを得た。この粉末1gをジュース10Lに均一に混ぜ合わせ、アラキドン酸含有トリグリセリドを含有するジュースを調製した。

## 請 求 の 範 囲

1. アラキドン酸またはアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を含んで成る、血管の老化に起因する症状又は疾患の予防又は改善作用を有する組成物。

2. 前記アラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物が、アラキドン酸のアルコールエステル、アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリド、又はリン脂質である、請求項1に記載の組成物。

3. 前記アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドにおいて、トリグリセリドを構成する全脂肪酸に占めるアラキドン酸の割合が20%以上である、請求項2に記載の組成物。

4. 前記アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドが、モルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、フィトフトラ (Phytophthora) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、クラドスポリウム (Cladosporium) 属、ムコール (Mucor) 属、フザリウム (Fusarium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ロードトルラ (Rhodotorula) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、エキノスポランジウム (Echinosporangium) 属、またはサプロレグニア (Saprolegnia) 属に属する微生物から抽出したものである、請求項2に記載の組成物。

5. 前記アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドが、1, 3-位に中鎖脂肪酸が結合し、そして2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを5%以上含むトリグリセリドである、請求項2に記載の組成物。

6. 前記中鎖脂肪酸が、炭素数6~12個を有する脂肪酸から選ばれたものである、請求項5に記載の組成物。

7. 前記血管の老化に起因する症状が、血管の弾力性の低下である、請求項1～6のいずれか1項に記載の組成物。

8. 前記血管の老化に起因する症状が動脈硬化であり、疾患が虚血性心疾患である、請求項1～6のいずれか1項に記載の組成物。

9. 前記虚血性心疾患が心筋梗塞及び/又は狭心症である、請求項8に記載の組成物。

10. 前記血管の老化に起因する症状が動脈硬化であり、疾患が脳卒中である、請求項1～6のいずれか1項に記載の組成物。

11. 前記脳卒中が脳出血及び/又は脳梗塞である、請求項10に記載の組成物。

12. アラキドン酸またはアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を含んで成る、血管の老化に起因する症状又は疾患の予防又は改善作用を有する飲食物。

13. 前記アラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物が、アラキドン酸のアルコールエステル、アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリド、又はリン脂質である、請求項12に記載の飲食物。

14. 前記アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドにおいて、トリグリセリドを構成する全脂肪酸に占めるアラキドン酸の割合が20%以上である、請求項13に記載の飲食物。

15. 前記アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドが、モルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、フィトフトラ (Phytophthora) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、クラドスポリウム (Cladosporium) 属、ムコール (Mucor) 属、フザリウム (Fusarium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ロードトルラ (Rhodotorula) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、エキノスポランジウム (Echinosporangium) 属、サプロレグニア (Saprolegnia) 属

に属する微生物から抽出したものである、請求項13に記載の飲食物。

16. 前記アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドが、1, 3-位に中鎖脂肪酸が結合し、そして2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを5%以上含むトリグリセリドである、請求項13に記載の飲食物。

17. 前記中鎖脂肪酸が、炭素数6~12個を有する脂肪酸から選ばれたものである、請求項16に記載の飲食物。

18. 前記飲食物が、機能性食品、栄養補助食品、特定保健用食品又は老人用食品である、請求項12~17記載の血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する飲食物。

19. 前記血管の老化に起因する症状が、血管の弾力性の低下である、請求項12~17のいずれか1項に記載の飲食物。

20. 前記血管の老化に起因する症状が動脈硬化であり、疾患が虚血性心疾患である、請求項12~17のいずれか1項に記載の飲食物。

21. 前記虚血性心疾患が心筋梗塞及び/又は狭心症である、請求項20に記載の飲食物。

22. 前記血管の老化に起因する症状が動脈硬化であり、疾患が脳卒中である、請求項12~17のいずれか1項に記載の飲食物。

23. 前記脳卒中が脳出血及び/又は脳梗塞である、請求項22に記載の飲食物。

24. アラキドン酸と、エイコサペンタエン酸及び/又はドコサヘキサエン酸との組み合わせにおいて、アラキドン酸/エイコサペンタエン酸及び/又はドコサヘキサエン酸比が0.25~8の範囲にあることを特徴とする飲食物。

25. 1,3-位に中鎖脂肪酸が結合し、そして2-位にアラキドン酸が結合したトリグリセリドを0.001重量%以上含有することを特徴とする飲食物。

26. 前記中鎖脂肪酸が、炭素数6～12個を有する脂肪酸から選ばれたものである、請求項25に記載の飲食物。

27. 血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は改善作用を有する飲食品の製造法であって、アラキドン酸及び／又はアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を単独で、あるいはアラキドン酸が実質的に含有しない、あるいは含有していても僅かな飲食品原料とともに配合することを特徴とする方法。

28. アラキドン酸及び／又はアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を、その投与が必要な対象に投与することを含んで成る、血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は治療方法。

Fig.1

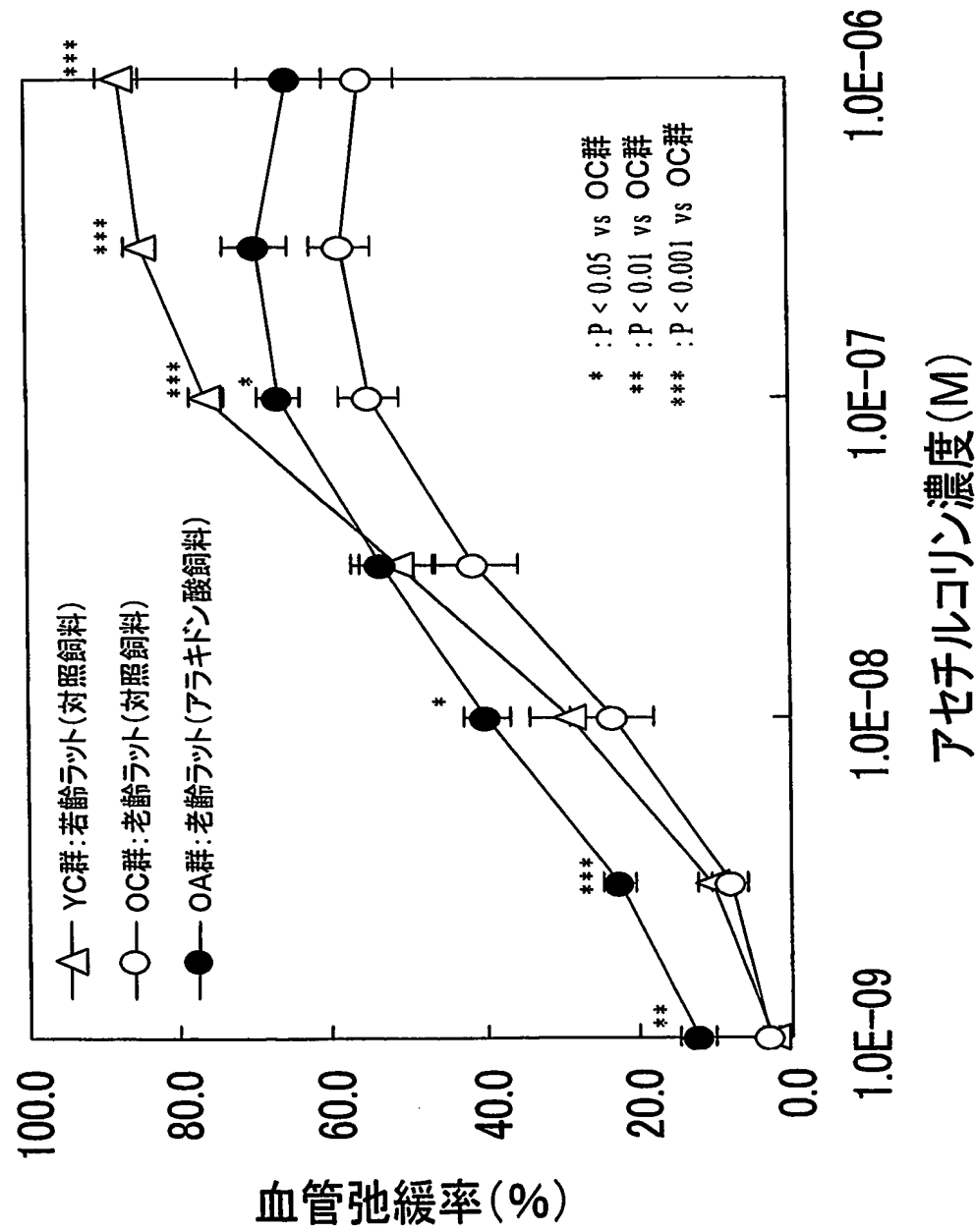


Fig. 2

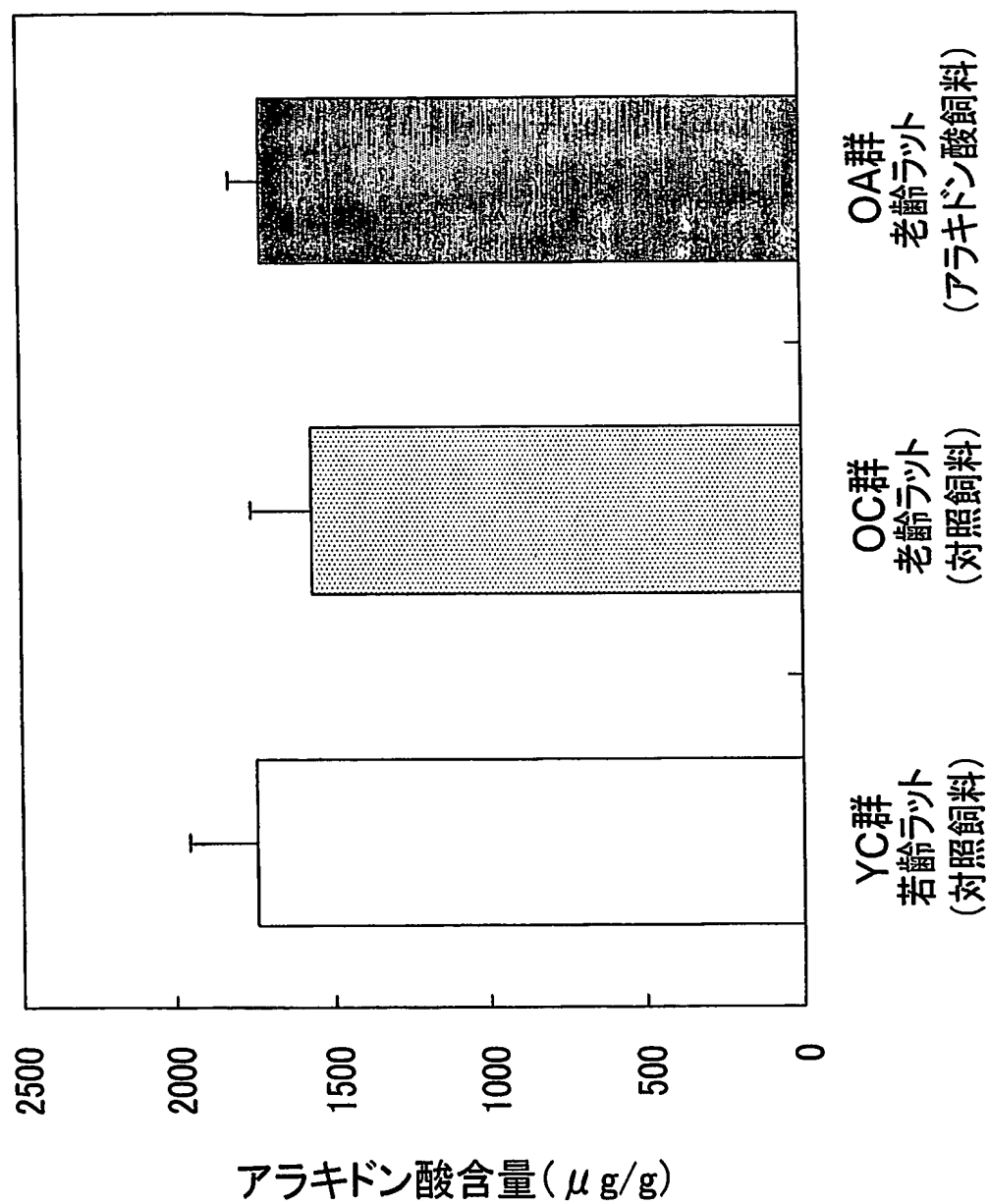
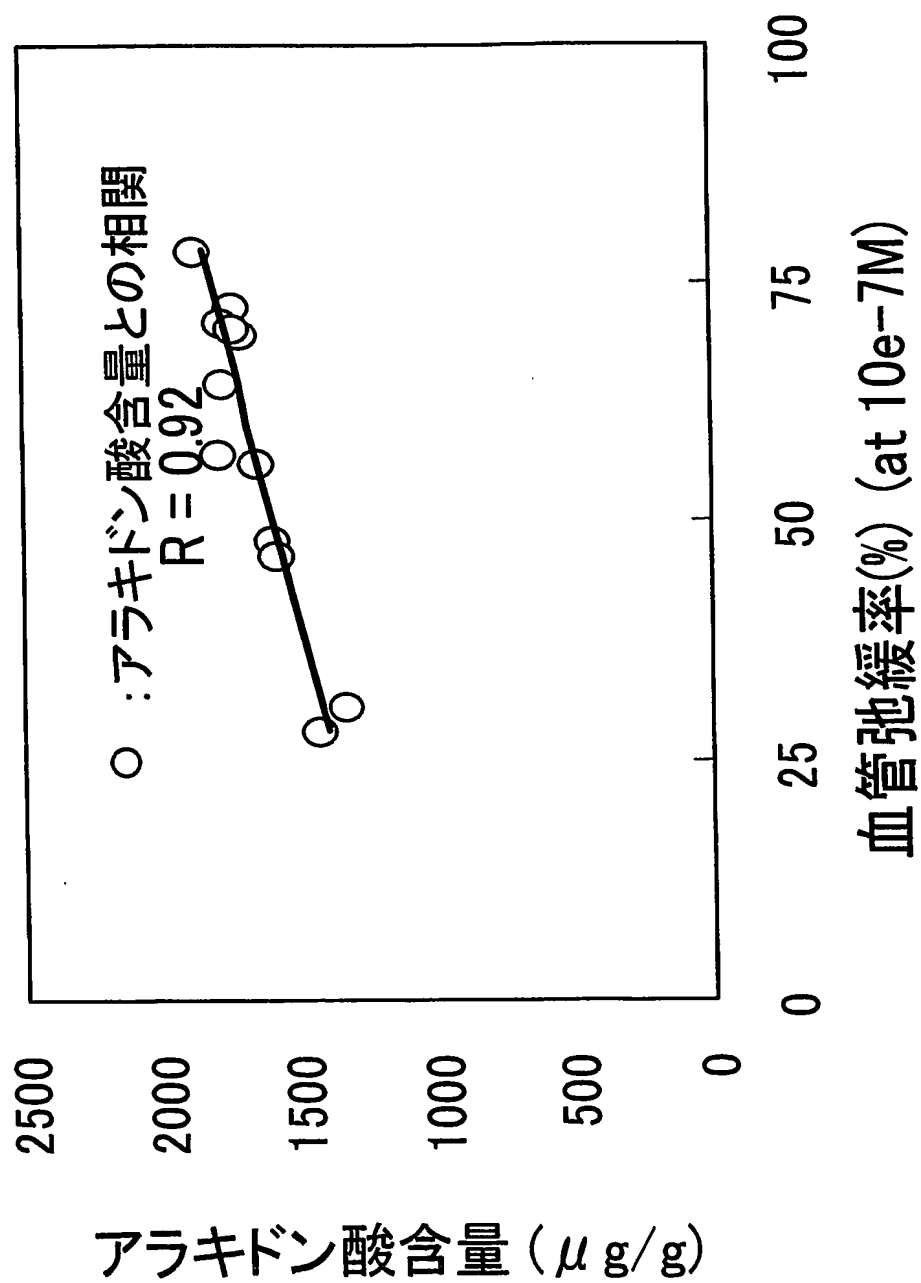




Fig. 3



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016351

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/202, 31/232, 31/66, A61P9/10, 9/00, A23L1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/00-31/66, A61P9/00-9/10, A23L1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/102394 A2 (Neptune Technologies & Bioressources inc.), 27 December, 2002 (27.12.02), Page 4, line 26 to page 5, line 10; example 1 & EP 1406641 A2 & JP 2004-534800 A	1-11
X	JP 2003-504333 A (LAXDALE LTD.), 04 February, 2003 (04.02.03), Claims 7, 16; Par Nos. [0005], [0006], [0019] & WO 2001/003696 A1	1-11
X Y	Mackay, K., Arachidonic acid protects neonatal rat cardiac myocytes from ischaemic injury through eprotein kinase C, Cardiovascular Research, 2001, 50, pages 65 to 74, Abstract, Results 3.3.	1-8 9-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 December, 2004 (15.12.04)

Date of mailing of the international search report  
18 January, 2005 (18.01.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016351

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2003-48831 A (Suntory Ltd.), 21 February, 2003 (21.02.03), Claims; Par Nos. [0021], [0028], [0044]; examples 1, 2 & WO 2003/013497 A1	12-27 1-11
Y	JP 2003-113120 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 18 April, 2003 (18.04.03), Par No. [0068] & WO 2003/013609 A1	8-11
A	Horrobin, D.F., Abnormal Membrane Concentration of 20 and 22-Carbon Essential Fatty Acids: A Common Link Between Factors and Coronary and Peripheral Vascular Disease?, Prostaglandins Leukotriens and Essential Fatty Acids, 1995, 53, pages 385 to 396, page 389, right column, Par No. [0003], line 14 to page 390, left column, line 23	1-11
A	JP 2001-31586 A (Sunstar Inc.), 06 February, 2001 (06.02.01), Par No. [0002] (Family: none)	1-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/016351

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 28

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 28 pertains to a method of the prevention of or treatments for symptoms or diseases attributable to the aging of blood vessels and falls under the category of methods for treatment of humans. It relates to a subject matter (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

I. The subject matter of claims 1-11 pertains to a composition which has the function of preventing or mitigating symptoms or diseases attributable to the aging of blood vessels and contains arachidonic acid and/or a compound having arachidonic acid as a constituent fatty acid.

II. The subject matters of claims 12-27 pertain to a food or beverage containing arachidonic acid and to a process for producing the food or beverage.

The technical feature common between these two groups of inventions is a composition containing arachidonic acid. However, this composition was known (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016351

## Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

for which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

## Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

before the filing of this application (see, for example, JP 2003-48831 A). These groups of inventions are not considered to be a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

## With respect to claims 1-5, 7-16, 18-23, 25, and 27

Claims 1, 12, and 27 include the term "a compound having arachidonic acid as a constituent fatty acid," claims 2 and 13 include the terms "an alcohol ester of arachidonic acid" and "a triglyceride having arachidonic acid as a constituent fatty acid or a phospholipid," and claims 5, 16, and 25 include the term "a medium-chain fatty acid." Because of these terms, compounds having an extremely large number of chemical structures are included. Since it is unclear as to what specific compounds the terms mean, the matters which should specify the subject matters of these claims are unclear.

The same applies to claims 3, 5, 7-11, 14, 15, and 18-23, in which any of those claims is cited.

## With respect to claims 1-6, 12-18, and 27

The term "symptoms or diseases attributable to the aging of blood vessels" given in claims 1, 12, and 27 is not obvious to persons skilled in the art and appears to be not defined in the description. It is hence unclear as to what specific symptoms or diseases that term means besides the symptoms and diseases specified in claims 7-11. Thus, the matters which should specify the subject matters of these claims are unclear.

The same applies to claims 2-6 and 13-18, in which any of those claims is cited.

In making an international search report, a search was made through prior-art techniques within a range reasonable in view of the scope of the inventions disclosed in claims 7-11 and in the description, because the inventions in this application are not sufficiently disclosed as stated above.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> A61K31/202, 31/232, 31/66, A61P9/10, 9/00, A23L1/30			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> A61K31/00-31/66, A61P9/00-9/10, A23L1/30			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2002/102394 A2 (Neptune Technologies & Bioressources in c.) 2002. 12. 27, 第4頁第26行-第5頁第10行目, Example 1 & EP 1406641 A2 & JP 2004-534800 A		1-11
X	JP 2003-504333 A (ラクスディル リミテッド) 2003. 02. 04, 【請求項7】, 【請求項16】, 【0005】, 【0006】, 【0019】 & WO 2001/003696 A1		1-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 15. 12. 2004		国際調査報告の発送日 18. 1. 2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 荒木 英則	4C 3437
		電話番号 03-3581-1101 内線 3451	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Mackay, K., Arachidonic acid protects neonatal rat cardiac myocytes from ischaemic injury through $\epsilon$ protein kinase C, Cardiovascular Research, 2001, 50, pp.65-74, Abstract, Results 3.3.	1-8
Y		9-11
X	JP 2003-48831 A (サントリー株式会社) 2003.02.21, 【特許請求の範囲】 , 【0021】 , 【0028】 , 【0044】	12-27
Y	【実施例1】 , 【実施例2】 & WO 2003/013497 A1	1-11
Y	JP 2003-113120 A (武田薬品工業株式会社) 2003.04.18, 【0068】 & WO 2003/013609 A1	8-11
A	Horrobin, D.F., Abnormal Membrane Concentration of 20 and 22-Carbon Essential Fatty Acids: A Common Link Between Factors and Coronary and Peripheral Vascular Disease?, Prostaglandins Leukotriens and Essential Fatty Acids, 1995, 53, pp.385-396, 第389頁右欄第3段落第14行目-第390頁左欄第23行目.	1-11
A	JP 2001-31586 A (サンスター株式会社) 2001.02.06, 【0002】 (ファミリーなし)	1-11

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 28 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲28は、血管の老化に起因する症状あるいは疾患の予防又は治療方法であり、人間を治療する方法に該当し、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

- I. 請求の範囲1-11に係る発明はアラキドン酸及び／又はアラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物を含んで成る、血管の老化に起因する症状又は疾患の予防又は改善作用を有する組成物に関するものである。
- II. 請求項12-27に係る発明はアラキドン酸を含有する飲食物及びその製造方法に関するものである。

そして、これら2つの発明群に共通する技術的特徴とはアラキドン酸を含有する組成物であるが、かかる組成物は本願出願前に公知のものであり (例えば、JP 2003-48831 Aを参照のこと。)、これらの発明群の間に単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



**請求の範囲 1-5、7-16、18-23、25及び27について**

請求の範囲 1、12及び27には「アラキドン酸を構成脂肪酸とする化合物」、請求の範囲 2及び13には「アラキドン酸のアルコールエステル」、「アラキドン酸を構成脂肪酸とするトリグリセリド、又はリン脂質」、請求の範囲 5、16及び25には「中鎖脂肪酸」なる記載があるが、かかる記載によっては著しく多数の化学構造のものが包含されるところ、具体的にいかなる化合物が該当するのかが明らかではないため、これらの請求の範囲に係る発明を特定する事項が不明確なものとなっている。

また、これらの請求の範囲を引用する請求の範囲 3、5、7-11、14、15及び18-23についても同様である。

**請求の範囲 1-6、12-18及び27について**

請求の範囲 1、12及び27にある「血管の老化に起因する症状又は疾患」なる記載は当業者にとり自明のものではなく、また明細書をみても定義がなされているものでもないから、かかる記載によっては請求の範囲 7-11において具体的に記載される症状及び疾患以外に具体的にはいかなる症状又は疾患を指すのかが明らかでなく、これらの請求項に係る発明を特定する事項が不明確なものとなっている。

また、これらの請求の範囲を引用する請求の範囲 2-6、13-18についても同様である。

そして、本願はこのように発明が十分に開示されたものではないため、国際調査報告の作成にあたっては、請求の範囲 7-11及び明細書において開示された発明の範囲からみて合理的な範囲内を先行技術調査の対象とした。